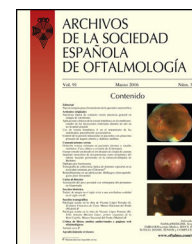




ARCHIVOS DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE OFTALMOLOGÍA

www.elsevier.es/ofthalmologia



Artículo original

Modelo animal de ectasia corneal en conejo mediante inyección intraestromal de colagenasa tipo II



L.E. Cano-Gómez^a, E. Casillas-Casillas^b, P. Andrade-Lozano^a, J. Ventura-Juárez^c
y L.F. Barba-Gallardo^{b,*}

^a Maestría en Investigación Biomédica, Centro de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México

^b Departamento de Optometría, Centro de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México

^c Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 17 de junio de 2022

Aceptado el 17 de enero de 2023

On-line el 20 de febrero de 2023

Palabras clave:

Queratocono

Colagenasa II

Inyección intraestromal

RESUMEN

Introducción: La colagenasa II ha sido utilizada para inducir queratocono experimental en modelos animales. Sin embargo, no ha sido estudiado su efecto cuando se administra por inyección intraestromal, por lo que el propósito de este estudio fue estudiar los efectos de la inyección intraestromal de colagenasa II sobre la superficie corneal y la morfología de la córnea.

Método: Se trabajó con 6 conejos Nueva Zelanda, se administró colagenasa II por inyección intraestromal (5 µL de 2,5 mg/mL) en los ojos derechos y solución salina balanceada en los ojos izquierdos. Se realizaron queratometrías para evaluar la alteración de la curvatura, también al séptimo día se obtuvieron las córneas y se realizó tinción hematoxilina-eosina para examinar los cambios morfológicos. Asimismo, se investigaron los cambios en la expresión de colágeno tipo I por tinción rojo sirio y PCR semicuantitativa.

Resultados: K1, K2 y Km presentaron diferencias en los promedios con cambios estadísticamente significativos. Los cambios morfológicos que se demostraron fueron degradación y disposición irregular del estroma corneal, incremento en la densidad celular de queratocitos y ligera infiltración celular. Finalmente se demostró que hay mayor expresión de fibras de colágeno tipo I en el grupo experimental a diferencia de los controles y el grosor de las fibras también aumentó por acción de la colagenasa II; sin embargo, en cuestión génica no hubo cambios en la expresión de colágeno tipo I a nivel molecular entre el grupo control y experimental.

Conclusiones: La colagenasa II administrada por inyección intraestromal es capaz de inducir cambios en la superficie corneal y el estroma, pudiendo simular un modelo de queratocono.

© 2023 The Authors. Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Oftalmología. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: barbaluis@yahoo.com (L.F. Barba-Gallardo).

<https://doi.org/10.1016/j.ofthal.2023.01.003>

0365-6691/© 2023 Los Autores. Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Oftalmología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Animal model of corneal ectasia in rabbits by intrastromal injection of type II collagenase

A B S T R A C T

Keywords:

Keratoconus
Collagenase II
Intrastromal injection

Introduction: Collagenase II has been used to induce experimental keratoconus in animal models. However, its effect when administered by intrastromal injection has not been studied, so the purpose of this study was to study the effects of intrastromal injection of collagenase II on corneal surface and corneal morphology.

Method: Six New Zealand rabbits were used, collagenase II was administered by intrastromal injection (5 μ L of 2.5 mg/mL) in the right eyes and balanced salt solution in the left eyes. Keratometry was performed to evaluate curvature alteration, also at day 7 corneas were obtained and hematoxylin-eosin staining was performed to examine morphologic changes. Likewise, changes in type I collagen expression were investigated by Sirius Red staining and semi-quantitative PCR.

Results: K1, K2, and Km presented differences in the means with statistically significant changes. The morphological changes that were demonstrated were degradation and irregular arrangement of the corneal stroma, increase in the cellular density of keratocytes and slight cellular infiltration. Finally, it was demonstrated that there is greater expression of type I collagen fibers in the experimental group as opposed to the controls and the thickness of the fibers also increased due to the action of collagenase II, however, in terms of genetics there were no changes in the expression of type I collagen at molecular level between the control and experimental groups.

Conclusions: Collagenase II administered by intrastromal injection is able to induce changes in the corneal surface and stroma, being able to simulate a model of keratoconus.

© 2023 The Authors. Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Oftalmología. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introducción

El queratocono es una ectasia corneal caracterizada por el adelgazamiento y protrusión cónica de la córnea con desarrollo de miopía y astigmatismo^{1,2}. Se ha clasificado como una enfermedad no inflamatoria, sin embargo, recientes investigaciones han demostrado la expresión de citocinas proinflamatorias en lágrimas de pacientes con queratocono e infiltrado de células inflamatorias³⁻⁵. Generalmente se presenta en la adolescencia, a partir de la segunda década de la vida, es posible posterior a cirugía refractiva. Se calcula que la prevalencia a nivel mundial es de 138/100.000 habitantes^{2,6}. Algunos de los factores de riesgo para su desarrollo son atopia, frotamiento de ojos, enfermedades congénitas, desórdenes del tejido conectivo y expresión de genes como VSX1 y SOD1^{1,7-12}. Hay diversas alteraciones fisiológicas en el estroma y epitelio corneal, lo que ocasiona desbalance en la producción de moléculas proinflamatorias, antiinflamatorias, proteasas y sus inhibidores, estrés oxidativo e hipersensibilidad celular¹³. Literatura publicada recientemente describe distintas proteínas encontradas en lágrimas y en córneas con queratocono, como la IL-1, IL-6, TNF- α , algunas metaloproteinasas, TGF- β , especies reactivas de oxígeno¹⁴⁻¹⁶, lo cual indica la activación simultánea de diferentes vías de señalización lo que podría establecerlo con un perfil inflamatorio.

El tratamiento depende de la severidad y tiene como objetivo atender alteraciones estructurales de la córnea, no se pretende un tratamiento directo hacia a la fisiopatología de

la enfermedad^{14,17-19}. Desarrollar un modelo animal con la aplicación de colagenasa para ocasionar la evolución de queratocono en ratones genera conocimiento para en un futuro desarrollar mecanismos de tratamiento desde la atención a su fisiopatología²⁰. Hay modelos desarrollados con gotas oftálmicas de colagenasa tipo II en conejo y varios estudios han demostrado inflamación en la fisiopatología del queratocono²¹. El objetivo de este estudio fue desarrollar un modelo animal en conejo mediante la inyección intraestromal de colagenasa tipo II que simule la alteración en la curvatura, la expresión de factores inflamatorios, estrés oxidativo e histopatología del queratocono.

Material y métodos

Animales y colagenasa tipo II

En este estudio se utilizaron 6 conejos Nueva Zelanda de 3,0-4,0 kg, se obtuvieron del Bioterio de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Aguascalientes, México). El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética para el uso de Animales en la Docencia e Investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (CEADI-UAA-001/003/2021). Los conejos se mantuvieron en un entorno controlado de 12 h luz/12 h oscuridad. Alimento y agua estuvieron disponibles *ad libitum*. Se proporcionó atención los 7 días del estudio. Los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal 6 mL/kg de pentobarbital sódico 1:10, para anestesia

tópica se usó gotas oftálmicas de clorhidrato de tetracaína (Lab. Sofia, Guadalajara, México) 5 mg/mL. Los animales fueron tratados de acuerdo con el protocolo de directrices de guías ARRIVE (V 2.0), (National Center for the Replacement, Refinement & and Reduction of Animals Research) para el uso de animales en investigación experimental. La colagenasa tipo II (Sigma-Aldrich) obtenida en polvo se disolvió en solución salina balanceada en dextrano (15%) a una concentración de 2,5 mg/mL.

Intervención

Se dividieron 12 ojos de 6 conejos en 2 grupos. Los ojos derechos grupo experimental, los izquierdos grupo control. Una vez anestesiados, se procedió a inyectar la córnea utilizando una aguja ultrafina con microscopio invertido por debajo del epitelio corneal. En el grupo experimental se inyectaron 5 μ L de colagenasa tipo II 2,5 mg/mL a temperatura ambiente. Posteriormente, se administró antibiótico cloranfenicol oftálmico para evitar una posible infección. Se realizó el mismo procedimiento en los ojos controles, administrando solución salina balanceada con dextrano 4%.

Queratometrías

Con un queratómetro (one-position) (Bausch and Lomb, NY, EE: UU.), se obtuvieron los meridianos principales en 3 mm centrales de córnea un día antes de la aplicación de la colagenasa intraestromal y 7 días después de la intervención. Se registró el promedio de las queratometrías de los 2 meridianos principales, curva menor (K1), curva mayor (K2) y el promedio de los 2 meridianos (Km), los resultados son expresados en dioptrías (D).

Histología

Las córneas se fijaron en paraformaldehído 4% durante 3 días y embebidas en parafina. Se realizaron cortes de 8 μ m de grosor de limbo a limbo para tinción de hematoxilina-eosina y rojo sirio. Las córneas teñidas con hematoxilina-eosina se observaron en campo claro y las teñidas con rojo sirio con luz polarizada. Para no inducir sesgo en la evaluación, un investigador realizó la técnica de histoquímica hasta culminar la fase de tinción y otro investigador con mayor experiencia en valoración en microscopía de luz y patología evaluó los cortes histológicos, sin conocer su procedencia, a fin de evitar una influencia en la exploración.

Extracción de ARN y RT-PCR

El ARN total se extrajo mediante un kit de purificación (cat. no. 12183555; Thermo Fisher, Inc., California, EE.UU.). La concentración y pureza del ARN se cuantificó con espectrofotómetro NanoDrop 2000. La síntesis de ADNc se realizó con el kit iScript (cat. 1708891; Bio-Rad Laboratories, Hércules, California, EE.UU.) y un termociclador (Thermo Fisher, Inc., California, EE.UU.). Para la PCR se utilizó Taq DNA Polymerase, Recombinant (cat. no. 11615-050; Thermo Fisher Scientific, Inc., California, EE.UU.). Se trabajó con 1 μ g/ μ L de ADNc en volumen final de 25 μ L. Los oligonucleótidos se muestran en

tabla 1. La expresión relativa de ARNm de colágeno I fue normalizada contra la expresión de GAPDH. Se analizó mediante el software ImageJ de Fiji. Los experimentos fueron repetidos por duplicado.

Análisis estadísticos

Los valores fueron expresados en media \pm error estándar. El análisis de los datos se realizó mediante el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). Los resultados de los grupos fueron comparados mediante una t de Student para muestras pareadas. Se consideró $p < 0,05$ para diferencia estadísticamente significativa.

Resultados

Alteración de la superficie corneal por acción de colagenasa II

Se midieron las queratometrías antes de administrar la colagenasa II por inyección intraestromal o en caso del control solución salina balanceada, y 7 días después de la aplicación se vuelve a medir las queratometrías en ambos meridianos y en el promedio de los 2 meridianos. A continuación se describen valores de córneas con colagenasa II, en K1, K2 y KM, respectivamente, (K1ED0 = 46,50 \pm 1,08; K1ED7 = 48,58 \pm 4,29); (K2ED0 = 46,42 \pm 1,28; K2ED7 = 49,50 \pm 2,75); (KMED0 = 46,60 \pm 1,17; KMED7 = 49,04 \pm 3,45); todas las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$); con respecto a los controles, se presentan en el mismo orden; (K1CD0 = 46,42 \pm 1,23; K1CD7 = 46,38 \pm 1,09); (K2CD0 = 46,33 \pm 1,29; K2CD7 = 45,50 \pm 0,89); (KMCD0 = 46,38 \pm 1,20; KMCD7 = 45,94 \pm 0,95), ($p > 0,05$) (fig. 1).

Cambios morfológicos en la córnea por acción de la colagenasa II

Los resultados obtenidos de la tinción hematoxilina-eosina indican que las córneas de controles a los 7 días mantuvieron morfología normal manifestada por el paralelismo de las fibras de colágena respecto al epitelio (flechas) (fig. 2A-C). Sin embargo, en el grupo con queratocono se observó una disposición irregular del epitelio y pérdida del paralelismo de las fibras de colágeno respecto al epitelio (flechas) en la capa de Bowman. Se presentó una reacción ligera de inflamación, con una alta densidad de queratocitos lo que generó un incremento en el grosor del estroma debido a la formación de la matriz extracelular (fig. 2D-F), lo cual indicaría un proceso de activación de queratocitos y regeneración del estroma (cicatrización estromal).

Expresión de colágeno tipo I

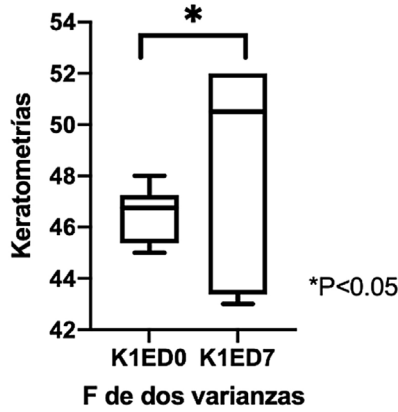
Para evaluar la expresión de colágeno tipo I se realizó la tinción de rojo sirio en tejido y PCR semicuantitativa. Con tinción rojo sirio, se observaron cambios en disposición de fibras de colágeno en el grupo experimental, en comparación con el grupo control; y en córneas control se observa la presencia de colágeno tipo I por las fibras rojas y colágeno tipo III por

Tabla 1 – Marcadores genéticos y sus correspondientes oligonucleótidos

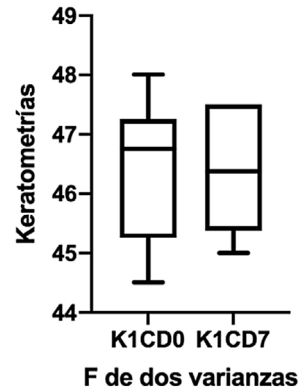
Gen	Secuencia directa (5'→3')	Secuencia inversa (5'→3')
COL1A2	GAAATCGGACCTGTTGGTAA	AACCAGGACTACCTCTCAG
GAPDH	CGAGCTGAACGGGAAACTCA	CCCAGCATCGAAGGTAGAGG

COL1A2: colágeno tipo I cadena alfa 2.

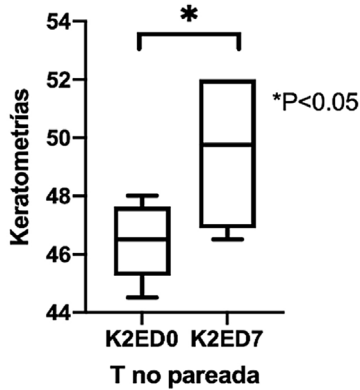
Keratometrías antes y después colagenasa



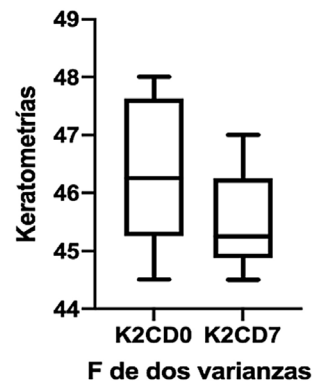
Keratometrías antes y después control



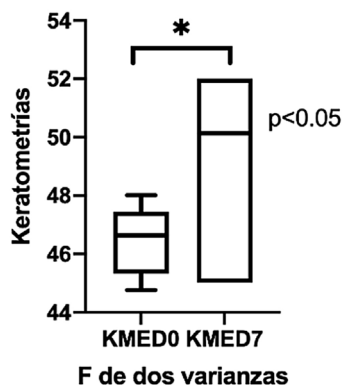
Keratometrías antes y después colagenasa



Keratometrías antes y después control



Keratometrías antes y después colagenasa



Keratometrías antes y después control

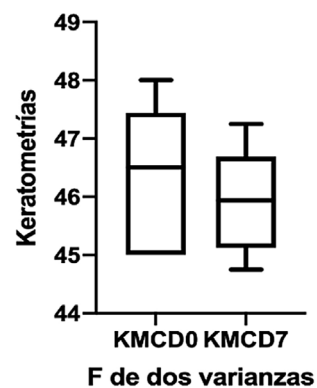


Figura 1 – Valores queratométricos antes y después de la administración de la colagenasa ii. Los datos se presentan como media ± error estándar. * Valor de $p < 0,05$ estadísticamente significativo.

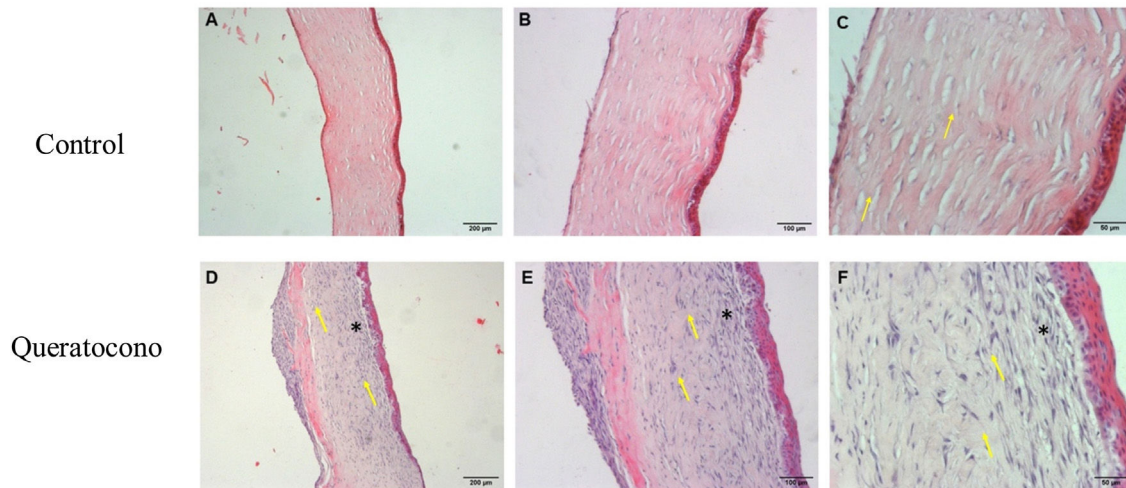


Figura 2 – Alteraciones morfológicas después de la administración de colagenasa II. Los cambios morfológicos de las córneas expuestas a colagenasa II muestran cambios característicos de un proceso inflamatorio y de regeneración, además de pérdida de integridad en la capa de Bowman, en comparación con los controles. (A-C) Controles. (D-F) Queratocono. Ambos con los objetivos 5x, 10x y 20x, respectivamente (aumento 500, 1000 y 2000, barra de escala 200 μm , 100 μm y 50 μm , respectivamente).

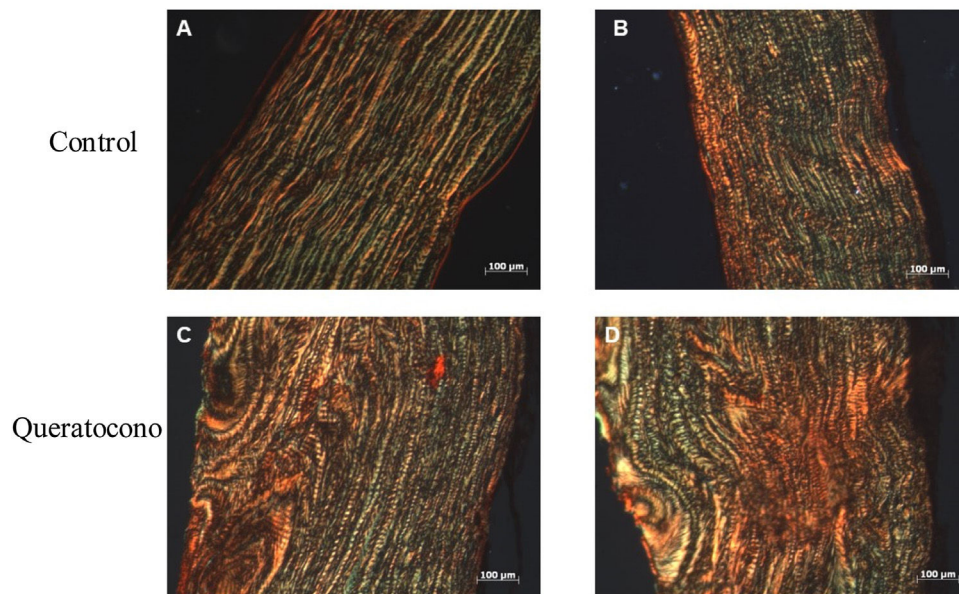


Figura 3 – Cambio en las fibras de colágeno en el modelo animal de queratocono. La alteración en las fibras de colágeno de las córneas con colagenasa II indican un proceso de regeneración del estroma corneal por acción de la colagenasa II, principalmente la síntesis de colágeno tipo I. (A-B) Controles. (D-E) Queratocono. Ambos con los objetivos 10x (aumento 1000, barra de escala 100 μm).

las fibras verdes (fig. 3A-B). En cambio, en las córneas experimentales demuestran una mayor presencia de colágeno tipo I y III en la lesión y estas fibras tienen un mayor grosor, lo cual indica el desarrollo de regeneración del estroma por la síntesis de la matriz extracelular (fig. 3C-D). Con respecto a la expresión génica de colágeno tipo I, no se observaron cambios significativamente estadísticos entre el grupo control y el grupo experimental ($p=0,77$) (fig. 4). No obstante, la tendencia en la gráfica demuestra un ligero incremento en la expresión de colágeno tipo I en el grupo experimental sobre el grupo

control, que de contar con una muestra mayor de córneas se podría aumentar la diferencia entre los grupos.

Discusión

De acuerdo con los antecedentes descritos de modelos animales de queratocono, se desarrolló este trabajo destacando los siguientes hallazgos: 1) la colagenasa II tiene la capacidad de alterar la curvatura de la córnea y el estroma corneal, 2) hay

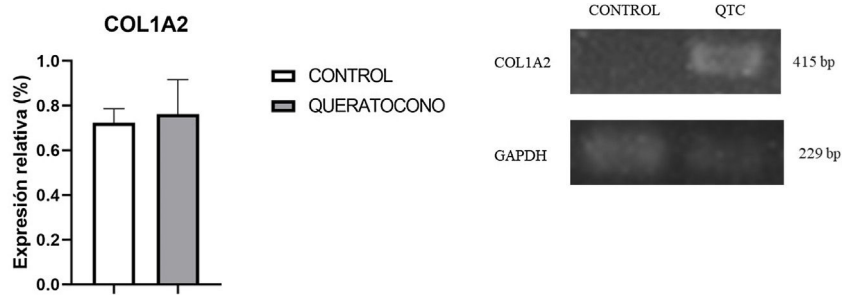


Figura 4 – Expresión génica de colágeno I en el modelo animal de queratocono. Aunque no hay cambios significativos, se observa una tendencia al incremento en la expresión de colágeno tipo I en el grupo con queratocono. Los datos se presentan como media \pm error estándar; n = 6 por grupo. bp: pares de bases; COL1A2: colágeno tipo I cadena alfa 2; QTC: queratocono.

un proceso de regeneración del estroma corneal en el sitio de lesión.

La colagenasa II es una proteasa usada en modelos animales de queratocono para degradar el colágeno tipo I y producir el adelgazamiento y alteración en la superficie de la córnea. Previamente Qiao reportó un modelo animal de queratocono por administración de colagenasa II en gotas oftálmicas a una concentración de 5 mg/mL, previo desbridamiento corneal²¹, sin embargo, aunque esta metodología ya estaba publicada también por otros autores, en nuestros resultados no se logró replicar el efecto encontrado por ellos. Qiao reportó en las queratometrías un incremento en las 3 mediciones en el día 7 y 14 con respecto al control, sin embargo, nosotros no encontramos cambios en las córneas de los conejos con el mismo procedimiento de gotas oftálmicas. En cambio, con el procedimiento de inyección intraestromal sí obtuvimos diferencias numéricas en los 3 valores de queratometrías (K1, K2 y Km), siendo estadísticamente significativa en las 3 medidas, el cual es un resultado similar al encontrado en el modelo de queratocono en humano, por lo que atribuimos este resultado a que la respuesta que evaluamos se debe al efecto de la colagenasa⁸. La disposición del ingreso de la colagenasa en la dirección donde se dirige podría estar ocasionando modificación en las láminas del estroma, causando que se debilite el meridiano que se vuelve más curvo, ocasionando que las fuerzas biomecánicas de las fibras posteriores perpendiculares ejerzan mayor presión en el meridiano más curvo²². Con respecto a la disminución de fibras de colágeno, disposición irregular de las fibras y hendiduras en el estudio de Qiao, nosotros encontramos en contraste un patrón diferente, es decir, un incremento en el número de queratocitos con posible activación en un proceso de regeneración del estroma con formación de una cicatriz estromal por activación de los queratocitos, coincidiendo con Song et al.²³. En el estudio de Moghadam en rata utilizó colagenasa por inyección intraestromal, reportando opacidad y deformidad en la córnea y daño severo en las fibras de colágeno, adelgazamiento epitelial y en estroma corneal²⁰. Nosotros, al replicar este modelo de inyección obtuvimos resultados similares, principalmente opacidad y deformidad de la córnea lo cual confirmó la alteración de la superficie a través de las queratometrías con daño severo en las fibras de colágeno e irregularidad en el epitelio corneal. Estos cambios se atribuyen a un proceso de cicatrización de la córnea por la colagenasa II y después de 3 días la opacidad desapareció.

La córnea esta formada por colágeno tipo I y V, y pueden encontrarse colágeno III, IV y VII en menores cantidades. Durante la regeneración de la córnea los queratocitos quiescentes se activan y se transdiferencian a miofibroblastos, con la finalidad de restituir la matriz extracelular mediante la síntesis de colágeno tipo I, III, IV y V²³. El colágeno III es expresado en la regeneración y en la pérdida de organización de fibras de colágeno tipo I, y es un marcador de fibrosis^{24,25}. Los resultados encontrados en la tinción de rojo sirio demuestran que las córneas control presentan fibras de colágeno III y dispuestas de manera regular, el colorante rojo sirio se une específicamente a las fibras de colágeno I, II y III, y por sus efectos birrefringentes se puede analizar bajo el microscopio de polarización; este procedimiento permite hacer análisis cuantitativos del contenido tisular de las fibras de colágeno mediante el software Fiji, siendo más específico que las técnicas histológicas tricromáticas, lo cual indica que el daño ocasionado por la aguja al inyectar la solución salina balanceada se regenera con fibras de nuevo colágeno. Con respecto, a las córneas con queratocono, hay mayor presencia de fibras de colágeno tipo I y dispuestas de manera irregular, indicando que está en proceso de regeneración. Nuestros resultados contrastan con la investigación de Lorenzo-Martín et al. donde evaluaron la composición del estroma durante la regeneración mediante la técnica de rojo sirio; ellos demuestran una menor presencia de colágeno tipo III en la córnea lesionada. Es importante mencionar que existe controversia en la interpretación de los resultados con esta técnica, ya que algunos autores refieren que el color se debe al tipo de colágeno y otros refieren el color a la disposición y grosor del colágeno, indicando que es una prueba únicamente para determinar la regularidad de las fibras de colágeno. En el estudio de Lorenzo-Martín et al. encontraron la sobreexpresión génica de colágeno I y III, coincidiendo con nuestros resultados en la expresión génica de colágeno II²⁶.

En el presente estudio no evaluamos el efecto de diversas concentraciones de la colagenasa II, ni se estudió el modelo a largo plazo, los cuales fueron limitantes. Es importante evaluar diferentes concentraciones con la finalidad de desarrollar un proceso de degradación más moderado, también hay que evaluar el tiempo de regeneración de la córnea a largo plazo con pruebas histológicas de inmunohistoquímica y la expresión génica en forma longitudinal para determinar la duración del modelo animal y determinar su viabilidad. Por ello, sugerimos

que se realicen más investigaciones partiendo de este modelo para determinar el tiempo de duración, así como, entender más en profundidad el proceso de daño inducido por esta enzima.

Conclusiones

Nuestro estudio presenta un modelo animal de queratocono con un método menos invasivo y rápido, sin embargo, también presentamos los efectos degradativos que produce la colagenasa II en el tejido. Es necesario seguir investigando para determinar si este modelo es viable para estudiar la fisiopatología y posibles tratamientos del queratocono.

Financiación

Proyecto financiado por la Universidad Autónoma de Aguascalientes: DGIyP- PIBB18-1.

Conflicto de intereses

Ninguno.

BIBLIOGRAFÍA

- Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol*. 1998;42:297-319.
- Ferrari G, Rama P. The keratoconus enigma: A review with emphasis on pathogenesis. *Ocul Surf*. 2020;18:363-73.
- Lema I, Sobrino T, Durán JA, Brea D, Díez-Feijoo E. Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears. *Br J Ophthalmol*. 2009;93:820-4.
- Fan Gaskin JC, Loh IP, McGhee CNJ, Sherwin T. An immunohistochemical study of inflammatory cell changes and matrix remodeling with and without acute hydrops in keratoconus. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:5831-7.
- Loh IP, Sherwin T. Is keratoconus an inflammatory disease? The implication of inflammatory pathways. *Ocul Immunol Inflamm*. 2022;30:246-55.
- Hashemi H, Heydarian S, Hooshmand E, Saatchi M, Yekta A, Aghamirsalim M, et al. The prevalence and risk factors for keratoconus: A systematic review and meta-analysis. *Cornea*. 2020;00:263-70.
- Lucas SEM, Burdon KP. Genetic and environmental risk factors for keratoconus. *Annu Rev Vis Sci*. 2020;6:5.1-22.
- Woodward MA, Blachley TS, Stein JD. The association between sociodemographic factors, common systemic diseases, and keratoconus: An analysis of a nationwide healthcare claims database. *Ophthalmology*. 2016;123:457-65.e2.
- Gordon-Shaag A, Millodot M, Shneur E, Liu Y. The genetic and environmental factors for keratoconus. 2015;2015:1-19.
- Alió JL, Vega-Estrada A, Sanz P, Osman AA, Kamal AM, Mamoon A, et al. Corneal morphologic characteristics in patients with Down syndrome. *JAMA Ophthalmol*. 2018;136:971-8.
- Heon E, Greenberg A, Kopp K, Rootman D, Vincent A. VSX1: A gene for posterior polymorphous dystrophy and keratoconus. *Hum Mol Genet*. 2002;11:1029-36.
- Udar N, Atilano SR, Brown DJ, Holguin B, Small K, Nesburn AB, et al. SOD1: A candidate gene for keratoconus. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:3345-51.
- Galvis V, Sherwin T, Tello A, Merayo J, Barrera R, Acera A. Keratoconus: An inflammatory disorder. *Eye*. 2015;29:843-59.
- Volatier TLA, Figueiredo FC, Connon CJ. Keratoconus at a molecular level: A review. *Anat Rec*. 2020;303:1680-8.
- Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MDP. Are proteinases the reason for Keratoconus? *Curr Eye Res*. 2010;35:185-91.
- Shetty R, Sharma A, Pahuja N, Chevour P, Padmajan N, Dhamodaran K, et al. Oxidative stress induces dysregulated autophagy in corneal epithelium of keratoconus patients. *PLoS One*. 2017;12:e0184628.
- Raiskup F, Theuring A, Pillunat LE, Spoerl E. Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in progressive keratoconus: Ten-year results. *J Cataract Refract Surg*. 2015;41:41-6.
- Vega-Estrada A, Alió JL, Plaza-Puche AB. Keratoconus progression after intrastromal corneal ring segment implantation in young patients: Five-year follow-up. *J Cataract Refract Surg*. 2015;41:1145-52.
- Jhanji V, Sharma N, Vajpayee RB. Management of keratoconus: Current scenario. *Br J Ophthalmol*. 2011;95:1044-50.
- Moghadam FA, Jahromy MH, Fazelipour S, Khakpour S, Younesian M. Induction of experimental keratoconus in mice using collagenase. *Physiol Pharmacol*. 2009;13:209-15.
- Qiao J, Li H, Tang Y, Song W, Rong B, Yang S, et al. A rabbit model of corneal ectasia generated by treatment with collagenase type II. *BMC Ophthalmol*. 2018;18:94. <http://dx.doi.org/10.1186/s12886-018-0760-z>.
- Lewis PN, White TL, Young RD, Bell JS, Winlove CP, Meek KM. Three-dimensional arrangement of elastic fibers in the human corneal stroma. *Exp Eye Res*. 2016;146:43-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2015.12.006>.
- Song P, Wang S, Zhang P, Sui W, Zhang Y, Liu T, et al. The superficial stroma scar formation mechanism in keratoconus: A study using laser scanning in vivo confocal microscopy. *BioMed Res Int*. 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7092938>.
- Bukowiecki A, Hos D, Cursiefen C, Erming SA. Wound-healing studies in cornea and skin: Parallels, differences and opportunities. *Int J Mol Sci*. 2017;18:1-24.
- Massoudi D, Maleceze F, Galiacy SD. Collagens and proteoglycans of the cornea: Importance in transparency and visual disorders. *Cell Tissue Res*. 2016;363:337-49.
- Lorenzo-Martín E, Gallego-Muñoz P, Mar S, Fernández I, Ciudad P, Martínez-García MC. Dynamic changes of the extracellular matrix during corneal wound healing. *Exp Eye Res*. 2019;186:1-10.